

新鮮伸展標本と新鮮凍結乾燥超薄切片による X-線微小部分分析

富山医科薬科大学解剖学第 2 教室

高 屋 憲 一

細胞の微細構造レベルの X-線微小部分分析は主に組織・細胞内の元素、特に金属の同定と分布の研究のために生物学や医学の分野で近年広く用いられている^{1-5, 7)}。しかし従来の超薄切片を用いた X-線微小部分分析では、試料作製中に生体内の細胞・組織に存在する電解質元素等がほとんど派失したり、移動や吸着し、生体内での分布とかけはなれたものとなる。無固定、無包埋で作製した新鮮伸展標本と新鮮凍結乾燥超薄切片の無染色での電子顕微鏡観察の後、X-線微小部分分析をおこなうと電解質元素等が良く保存され、生体内の分布に近いデータが得られる^{1-5, 7)}。これらの標本の作製法、電子顕微鏡による像観察および X-線微小部分分析、特に定量的 X-線微小部分分析法について説明し、いくつかの応用例を紹介する。

材料と方法

1. 新鮮標本の作製

1) 新鮮伸展標本

コロディオ膜 (2% isoamyl acetate 液より作製) をはったグリッド (Cu または Al) 上にヒト、ラット、マウス、モルモットとカニクイザルの新鮮な血液の 1 滴の塗抹を作製し、空気乾燥をした^{7, 10)}。

2) 新鮮凍結乾燥超薄切片

新鮮組織片を液体窒素で冷却したフレオンにより凍結し、Sorvall MT2-B の凍結切削装置にてダイヤモンドナイフを用いて超薄切片 (160nm) をつくり、粘性処理をしたグリッド (Ti, Al, Cu) に真鍮棒先端で押さえつけ、ガラス装置を用いて乾燥窒素ガス流により凍結乾燥する⁸⁾。カニクイザル (*Macaca irus*) のひ臓の wedge-biopsy を用いたもの¹⁰⁾ と雨蛙 (*Hyla arborea japonica*) の背部皮膚の新鮮凍結乾燥超薄切片を作製した¹¹⁾。

2. 電子顕微鏡観察

1) 透過型電子顕微鏡

新鮮伸展標本と新鮮凍結乾燥超薄切片は蒸着なしで

加速電圧 200kV (200CX) で、まずメッシュ像を観察し試料の位置と状態をチェックし、その後拡大して観察を行なう。さらにエネルギー分散型 (EDS) 分析を行なう加速電圧 80kV で透過走査 (STEM) 像を観察し微細構造の確認を行なう。電子ビームによる試料の損傷を出来るだけ少なくし、さらに観察中に切片が移動したり屈曲するのを避ける目的で 1000kV 電顕による観察を行なった。

2) 走査型電子顕微鏡

走査型分析電子顕微鏡 (X-650) の STEM の装置を用い、カーボンブロックにより改良した試料ホルダーにより、加速電圧 40kV で STEM 像を観察し、200kV 電顕で見られた分析を行なう部位の像を確認し EDS 分析を行なう。初めは試料電流 0.1-0.2nA で観察し、さらに分析を行なう 2nA で微細構造を確認した。

3. EDS X-線微小部分分析

1) 200kV 電顕と EDS の組み合わせ

加速電圧 80kV にて STEM 像で、位置を定めて EDSII (Ortec) により 100 秒間分析を行ない、Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Zn の各元素の K α 線のエネルギー置のカウント数を記録し、バックグラウンド除去後 net のカウント数を求めて P/B を計算し各元素の濃度を半定量的に比較する。分析時間は前もって 25 秒ごとに 300 秒間まで上記元素につき P/B 比を求め時間による変化より、最も安定した時間の 100 秒間を用いた。主に血小板の顆粒と巨核球の顆粒の分析を行なった。

2) 走査型分析電顕の EDS による定量分析

X-650 により STEM 装置に特製の試料ホルダーを用いて加速電圧 40kV、試料電流 2nA 分析時間 100 秒で、EDS (Kevex 7000) 分析を行なう。Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn の K α 線と Ba の L α 線の P/B 比を求めた。標準試料として polyvinylpyrrolidone (PVP)-K30 の 20% 溶液に

上記元素を含む NaCl や MgCl₂ 等の化合物を溶かした液の新鮮凍結乾燥超薄切片を作製し各元素の P/B 比を求めた。パーソナルコンピューター (PC-8801) により定量化のプログラムを作り、組織切片分析結果の P/B 比より濃度を計算し、mM/kg 湿重量で表した¹¹⁾。

3) 分析電子顕微鏡 (120kV TEM と EDS) による半定量分析

さらに雨蛙 (*Hyla arborea japonica*) の背部皮膚の新鮮凍結乾燥超薄切片では、1000kV 電顕にて観察した後、透過型分析電子顕微鏡 (120kV) により加速電圧 60kV で EDS 分析を行なった。この加速電圧を用いたのはヒトの血小板の新鮮伸展標本を用いて dense bodies の分析に、加速電圧を 20-100kV まで変代させマグネシウムのピークとバックグラウンドのカウントの比 (P/B) 比を求め、加速電圧 60kV が最も高い値が得られたことによる。これは主に雨蛙の背部皮膚の出来るだけ広い範囲を観察し、メラニン顆粒と海綿層にある高密度の顆粒とを透過像と EDC 分析により比較することと、メラニン顆粒内微小部位による差を調べることが目的である。

結果と考察

新鮮凍結乾燥超薄切片の電顕観察において 200kV の加速電圧では通常の加速電圧の電顕観察に比べて切片の移動やめくれが非常に少ない。しかし観察中、特に高倍率では上記の変化が完全に無くなるまでに長い時間の電子線照射が必要であるが、1000kV での観察では上記の変化は非常に少なく、低倍率の広い範囲の観察、高倍率の観察および写真撮影が可能であり、目的とする微細構造の組織内での位置の確認が容易である。

ヒト血小板の伸展標本、ラット骨髓新鮮凍結乾燥超薄切片の巨核球、雨蛙背部皮膚新鮮凍結乾燥超薄切片の電子顕微鏡像を図 1, 3, 4 に示す。図 2 はヒト血小板 dense body の EDS 分析のスペクトルで磷とカルシウムに高いピークがみられる。

ヒトと動物の血小板の dense bodies とサルのひ臓とラットの骨髓の新鮮凍結乾燥超薄切片による巨核球の高密度顆粒に検出された磷、マグネシウム、カルシウムの元素により 4 種類に分類しその頻度を比較すると (表 1, 2), 磷が多く含まれることは共

通であるが、ヒトとサルではカルシウムが、他の動物ではマグネシウムが主であることが、巨核球の段階から既に定まっていると考えられる。

Table 1. Phosphorus, calcium and magnesium in platelet dense bodies

animal species	platelets	dense bodies (number)	percentage of dense bodies (%)			
			P	P & Mg	P, Mg & Ca	P & Ca
human (5)	8	49	0	0	4	96
<u>Macaca irus</u> (1)	3	24	8	0	17	75
rat (6)	17	41	12	51	34	3
mouse (6)	18	111	22	50	23	5
guinea pig (4)	12	96	5	51	32	12
cat (5)	9	64	25	22	19	34

Table 2. Phosphorus, calcium and magnesium in platelet dense bodies and megakaryocyte dense granules

animal species	dense bodies & granules (number)	percentage of dense bodies & granules (%)			
		P	P & Mg	P, Mg & Ca	P & Ca
<u>Macaca irus</u> (1)					
platelets (9)	69	7	1	22	70
megakaryocytes (6)	198	11	5	19	65
rats (6)					
platelets (17)	41	12	51	34	3
megakaryocytes 1-5	84	7	50	37	6
megakaryocytes 1-3	30	10	70	20	0
megakaryocytes 4 & 5	54	6	39	46	9

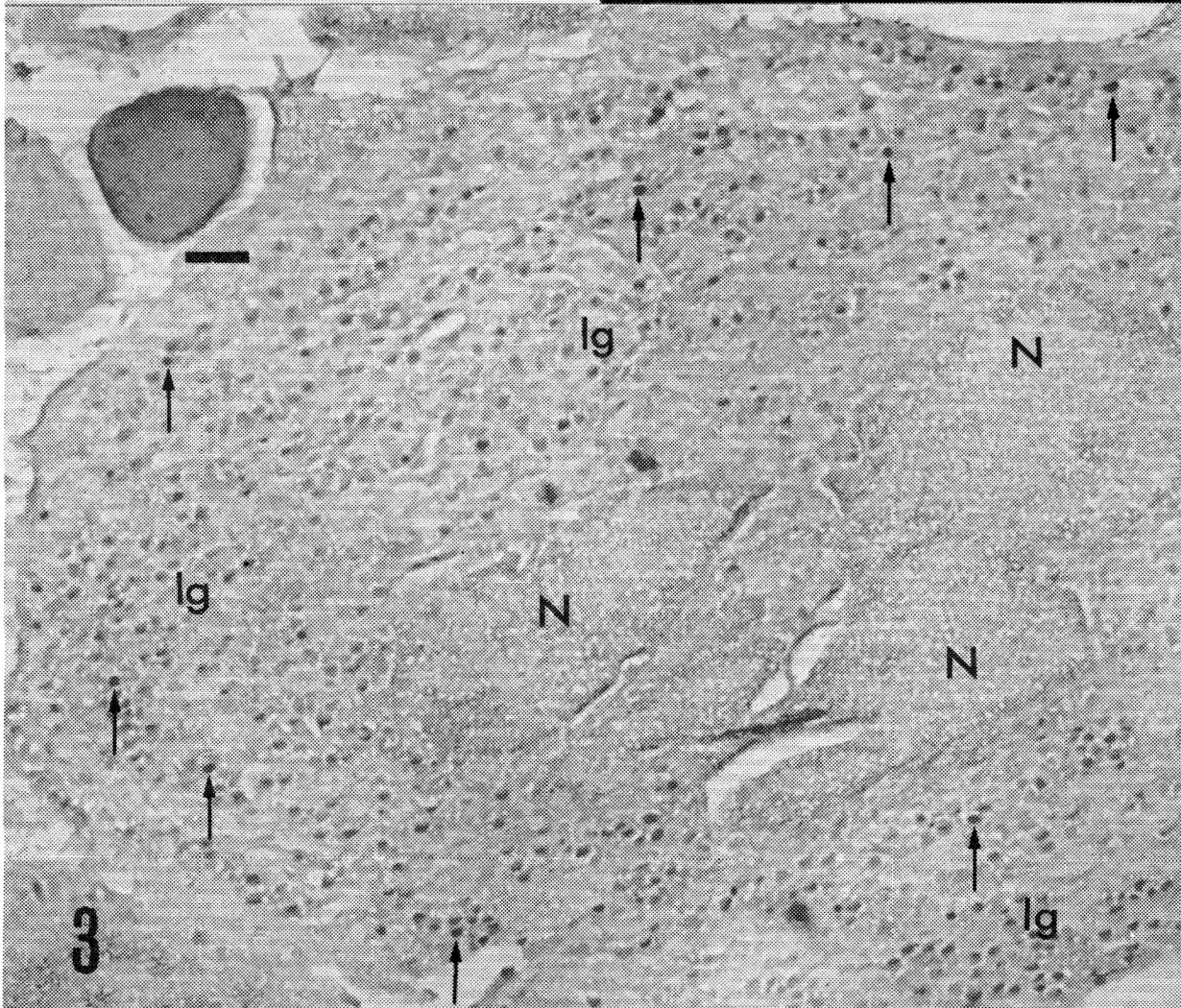
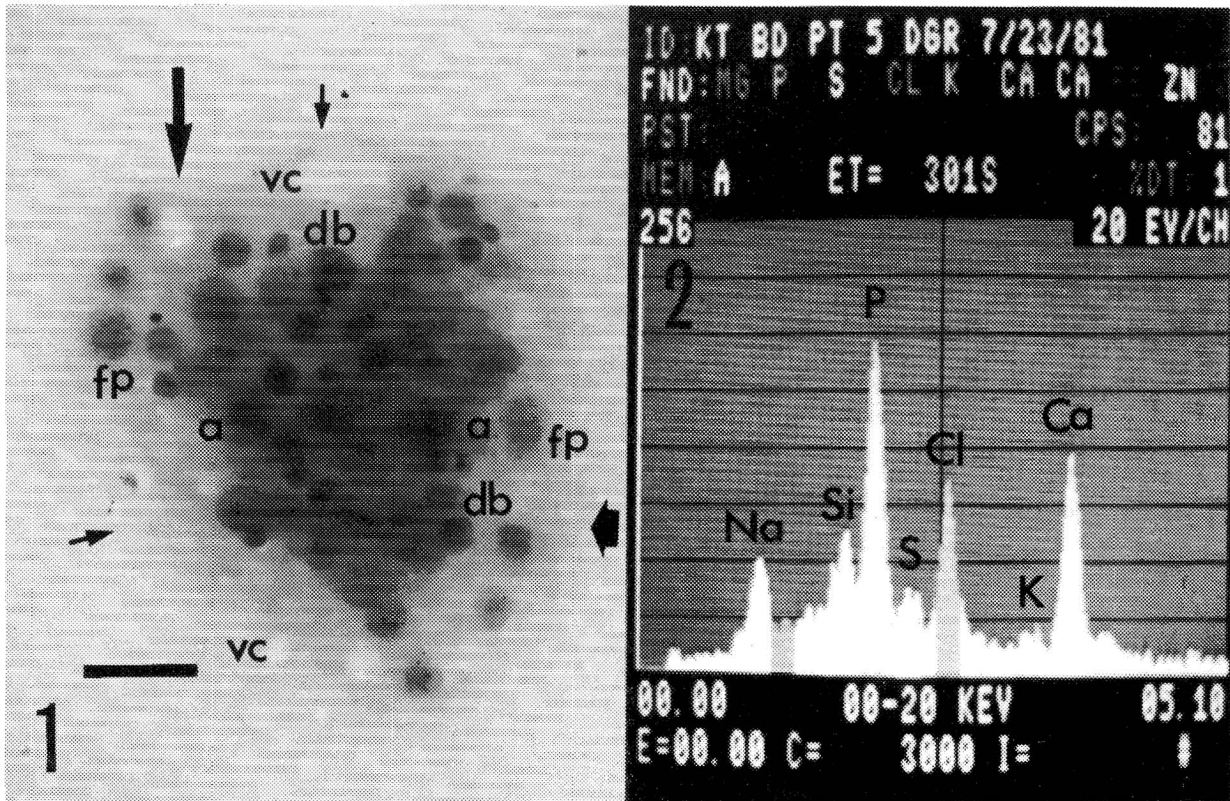
雨蛙背部皮膚のメラニン顆粒とカルシウム顆粒の X-650 と EDS (Kevex-7000) による定量的 X-線微小部分析の結果を表 3 に示す。メラニン顆粒にはマ

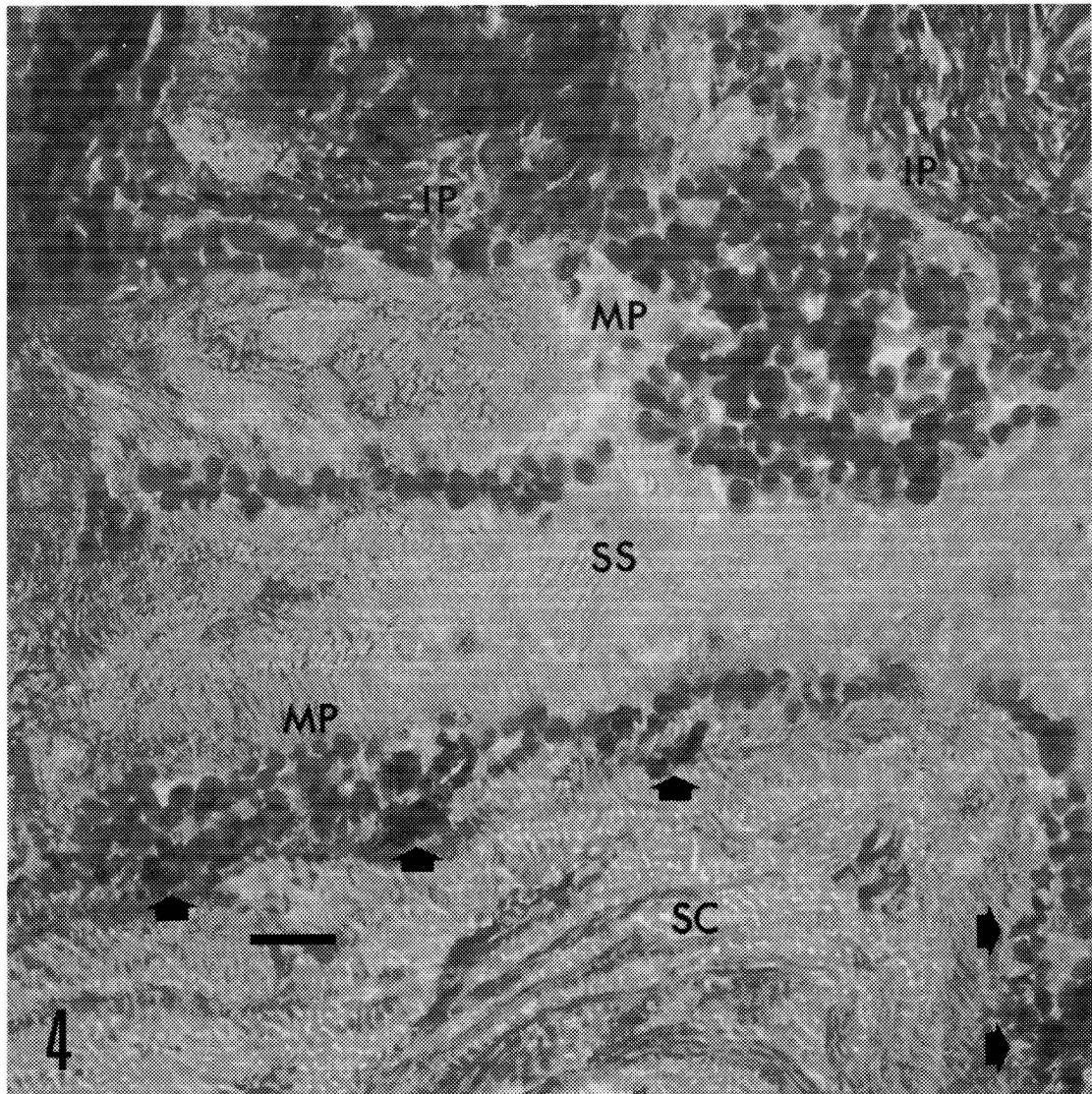
Table 3. Element concentration in treefrog skin. Quantitative EDS on fresh frozen dried cryosections (160nm)

(mM/Kg wet weight)									
site of analysis (number)				element					
	Na	Mg	P	S	Cl	K	Ca	Fe	Zn
melanin granules (30)	26.4	124.9		76.89.5	37.0	89.7	96.6	1.3	27.2
calcium granules (10)	9.9	28.4	233.9	0.4	19.6	22.0	511.3	2.2	4.2

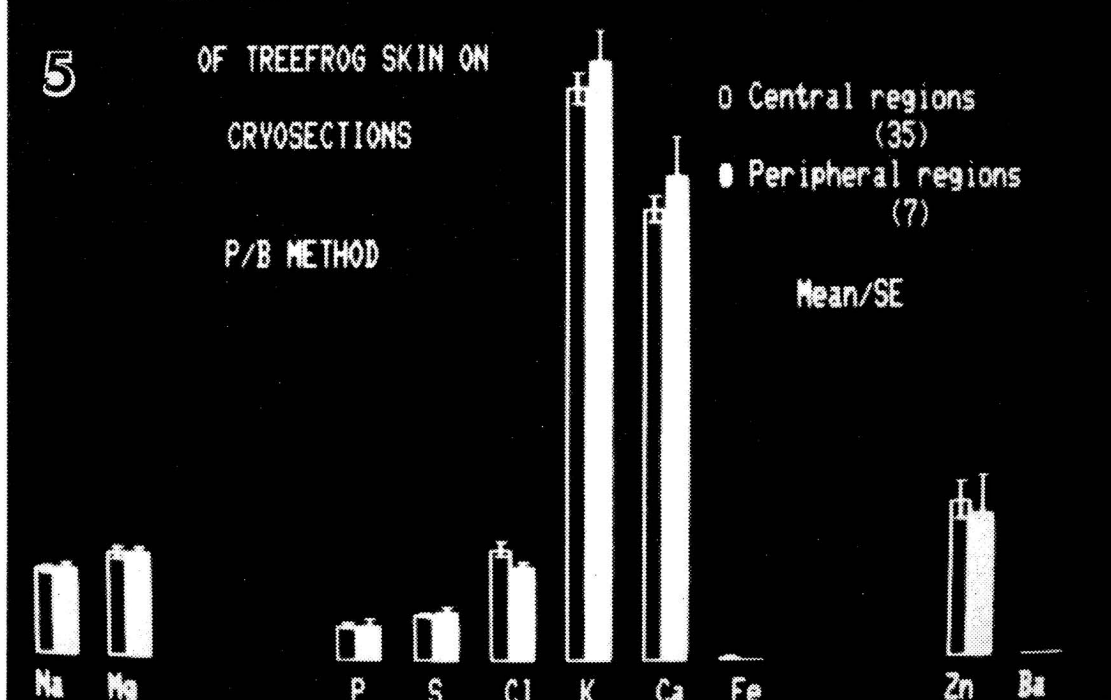
ネシウム、カルシウム、亜鉛等の金属元素が含まれるが、カルシウム顆粒は特に大量の磷とカルシウムが存在することが明らかである。メラニン顆粒内の元素の組成を中心部と周辺とで比較すると、ほとんど差が見られない (図 4)。

以上、いくつかの例で示したように、新鮮伸展標本や新鮮凍結乾燥超薄切片のような無処理の標本を用いて、電子顕微鏡観察と EDS X-線微小部分析により、いろいろな細胞でナトリウムからウランまでの元素を検出することができ、半定量法により各元素の濃度を比較することが可能である。さらに定量的分析法により微細構造における元素組成を知ることができる。この方法を用いていくつかの元素ではその機能を推察することも可能である。近年、電子





EDS X-RAY MICROANALYSIS OF MELANOPHORE GRANULES



エネルギー損失分光法 (EELS) と組み合わせることによりナトリウムよりも軽い元素の検出や、カルシウム等の元素の高感度の定量分析が行なわれつつある⁶⁾。

図 の 説 明

- 図 1 . ヒト血液血小板の新鮮伸展標本. 普通の透過型電子顕微鏡による観察. 加速電圧, 50kV. db: dense bodies, ag: α 顆粒, vc: 空胞, fp: 微細粒子を持つ小体が区別される。矢印は細胞の辺縁を指す。bar = $1\mu\text{m}$
- 図 2 . ヒト血小板 dense bodies の EDS スペクトル. 燐とカルシウムに高いピークが見られ, 硫黄, カリウムに中等度のピークが見られ, ナトリウムとクロールは血しょうからのものと考えられる。
- 図 3 . ラット骨髓の新鮮凍結乾燥超薄切片の巨核球. 200kV電顕による観察. 複雑な輪郭を持つ大きな核(N)と広い細胞質には周辺部に高密度の果粒(矢印)と多数の低密度の顆粒(lg)が見られる。bar = $1\mu\text{m}$
- 図 4 . 雨蛙背部皮膚の新鮮凍結乾燥超薄切片. 1000 kV電顕による観察. 真皮海綿層(SS)の表皮近くに虹色素胞(IP), 黒色素胞(MP)があり, ち密層(SC)に接して黒色素胞(MP)と高密度顆粒(カルシウム果粒)(矢印)の帯が並んでいる。bar = $1\mu\text{m}$
- 図 5 . 黒色素胞(melanophores)の顆粒の中心と周辺部で検出された元素の比較。ほとんど差が無いことに注意。

謝 辞

超高压電子顕微鏡(H-1250M)による研究は国立生理学研究所(岡崎)で, 分析電子顕微鏡(EM-002A と EDAX)は明石製作所で行なった。

文 献

- 1) Erasmus D. A. : Electron Probe Microanalysis in Biology., London : Chapman and Hall, 1978.
- 2) Lechene C. P. and Warner R. R. : Microbeam Analysis in Biology. Academic, New York, 1979.
- 3) Hall T., Echlin P. and Kaufmann R. : Microprobe Analysis as Applied to Cells and Tissues. Academic, London, 1974.
- 4) Hayat M. A. : X-Ray Microanalysis in Biology. Baltimore : University Park Press, 1980.
- 5) Hutchinson, T. E. and A. P. Somlyo. : Microprobe Analysis of Biological Systems. Academic, New York, 1981.
- 6) Shuman H. and Somlyo A. P. : Electron energy loss analysis of near-traceelement concentrations of calcium. Ultramicroscopy 21 : 23-32, 1987.
- 7) Takaya K. : Electron probe microanalysis of the dense bodies of human blood platelets. Arch. histol. japon. 37 : 335-341, 1975.
- 8) Takaya K. : Preparation of fresh-frozen dried ultrathin sections by drying without vacuum. Acta anat. 96 : 248-258, 1976.
- 9) Takaya K. : X-ray microanalysis using unstained, fresh air-dried tissue preads. Calcium and magnesium in the granule of pancreatic acinar cells, platelets, melanocytes and mast cells. Acta Histochem. Cytochem. 12 : 237-240, 1979.
- 10) Takaya K. : Energy dispersive X-ray microanalysis of platelets and megakaryocytes of several mammals using air-dried spreads and fresh frozen dried sections. J. Physique 45 (C2) : 485-489, 1984.
- 11) Takaya K. Ultrahigh and analytical electron microscopy of frog skin on fresh frozen dried cryosections. 11th International Congress on X-Ray Optics and Microanalysis : 319-323, 1986.